GENSCREEN® HIV1/2 version 2

1 plaque - 96 tests 72278

5 plaques - 480 tests 72279

POUR LA DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-VIH1 ET ANTI-VIH2 DANS LE SÉRUM/PLASMA PAR TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE

IVD

Contrôle de qualité du fabriquant

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société **BIO-RAD** *sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.*

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par notre société.

TABLE DES MATIÈRES

1 - INTÉRÊT CLINIQUE

2 - PRINCIPE DE LA TROUSSE GENSCREEN® HIV1/2 version 2

3 - COMPOSITION DE LA TROUSSE GENSCREEN® HIV1/2 version 2

4 - VALIDITÉ - CONSERVATION

5 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

6 - ÉCHANTILLONS

7 - PRÉCAUTIONS

8 - RECONSTITUTION DES RÉACTIFS

9 - MODE OPÉRATOIRE

10 - REMARQUES

11 - CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

12 - VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DU CONJUGUÉ

13 - PERFORMANCES

14 - LIMITES DU TEST

15 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - *INTÉRÊT CLINIQUE*

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie infectieuse d'origine virale se traduisant par un déficit profond de l'immunité cellulaire.

Deux types de virus apparentés au groupe des lentivirus ont été isolés des lymphocytes de patients atteints de SIDA ou de ses prodromes.

Le premier nommé VIH1 a été isolé en France, puis aux Etats-Unis.

Le second nommé VIH2 a été isolé chez deux malades d'origine africaine et s'est révélé être responsable d'un nouveau foyer de SIDA en Afrique de l'Ouest.

Les connaissances sur la variabilité génétique des souches des virus VIH ont été acquises par le séquençage des gènes GAG, POL et ENV des souches représentatives de chacun des sous-types. Les virus VIH1 sont divisés en 2 groupes : le groupe M (comprenant 9 sous-types (A à I) et le groupe O. Le virus VIH2 comprend 5 sous-types.

La répartition géographique des différents sous-types est maintenant assez bien définie. Certains variants VIH1 n'ont que 70% d'homologie pour les gènes GAG et POL avec les principaux isolats et seulement 50% pour le gène ENV; ces différences peuvent expliquer l'échec du diagnostic de l'infection chez certains patients.

Les différentes souches du virus VIH2 présentent des communautés antigéniques avec le virus simien SIV au niveau de toutes les protéines (protéines d'enveloppe et protéines internes : hétérologie : 30%), mais présentent moins de 40% d'homologie avec les protéines d'enveloppe du virus VIH1.

Le test GENSCREEN® HIV1/2 version 2 permet la détection simultanée des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2.

2 - *PRINCIPE DE LA TROUSSE GENSCREEN® HIV1/2* version 2

GENSCREEN® HIV1/2 version 2 est une technique immuno-enzymatique basée sur le principe du sandwich en deux étapes pour la détection des différents anticorps associés aux virus VIH1 et/ou VIH2, dans le sérum ou plasma humain.

GENSCREEN® HIV1/2 version 2 repose sur l'utilisation d'une phase solide préparée avec des antigènes purifiés (protéines recombinantes gp160 et p25 du virus VIH1 et peptide mimant l'épitope immunodominant de la glycoprotéine d'enveloppe du virus VIH2) et d'un conjugué préparé avec des antigènes marqués à la peroxydase (protéine recombinante nucléocapsidique et peptides mimant les épitopes immunodominants des glycoprotéines d'enveloppe des virus VIH1 et VIH2).

La mise en oeuvre du test comprend les étapes réactionnelles suivantes :

1. Les sérums à étudier, ainsi que les sérums de contrôle sont distribués dans les cupules. Si des anticorps anti VIH1 et/ou VIH2 sont présents, ils se lient aux antigènes fixés sur la phase solide.

   Le dépôt d'échantillon est validé par un changement de couleur, du violet au bleu (SDP = Sample Deposition Proof)
2. Les antigènes VIH1 et VIH2 purifiés, marqués à la peroxydase, sont ajoutés après lavage. Ils se lient à leur tour aux IgG et/ou IgM et/ou IgA, retenus par la phase solide.
3. La présence de l'enzyme immobilisée sur les complexes est révélée par incubation en présence du substrat après élimination de la fraction de conjugué restée libre.
4. Après arrêt de la réaction, la lecture s'effectue au spectrophotomètre à 450/620-700 nm.

L'absorbance observée pour un échantillon permet de conclure quant à la présence ou l'absence d'anticorps anti-VIH1 et/ou VIH2.

3 - *COMPOSITION DE LA TROUSSE GENSCREEN® HIV1/2* version 2

Tous les réactifs sont destinés à l'usage exclusif du diagnostic *in-vitro*.

ETIQUETAGE	NATURE DES RÉACTIFS	PRÉSENTATION	
		72278	72279
R1	**Microplaque :** 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec les antigènes VIH1 et VIH2 purifiés	1 plaque	5 plaques
R2	**Solution de lavage concentrée (20x)** Tampon Tris NaCl, pH 7,4 Conservateur : ProClin ™300 (0,04 %)	1 flacon 70 ml	1 flacon 235 ml
R3	**Sérum de contrôle négatif (humain)**	1 flacon 1 ml	1 flacon 1 ml
R4	**Sérum de contrôle seuil (humain)**	1 flacon 2,5ml	1 flacon 2,5 ml
R5	**Sérum de contrôle positif (humain)**	1 flacon 1 ml	1 flacon 1 ml
R6	**Diluant des échantillons**	1 flacon 14 ml	2 flacons 2 x 10 ml
R7a	**Conjugué** Antigènes VIH1 et VIH2 purifiés marqués à la peroxydase, lyophilisés	1 flacon qsp 12.5 ml	2 flacons qsp 2 x 30 ml
R7b	**Diluant du conjugué**	1 flacon 12,5 ml	2 flacons 2 x 30 ml
R8	**Tampon pour substrat de la peroxydase** Solution de Citrate de Sodium et d'Acetate de Sodium pH 4.0, contenant 0,015% d'H_2O_2 et 4% de DMSO	1 flacon 60 ml	2 flacons 2 x 60 ml
R9	**Chromogène :** Solution contenant de la tetramethyl benzidine (TMB)	1 flacon 5 ml	2 flacons 2 x 5 ml
R10	**Solution d'arrêt** acide sulfurique 1N	1 flacon 28 ml	3 flacons 3 x 28 ml
	Feuilles adhésives pour microplaques	4	12

4 - *VALIDITÉ - CONSERVATION*

La trousse doit être gardée à +2-8°C. Chaque élément de la trousse GENSCREEN® HIV1/2 version 2 conservé à +2-8°C peut être utilisé après une première ouverture jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret, sauf indication spécifique :

R1 : Après ouverture du sachet sous vide, les barrettes conservées à +2-8°C dans leur sachet d'origine, refermé avec soin, sont utilisables pendant 4 semaines.

R2 : La solution de lavage diluée peut être conservée à +2- 30°C pendant 2 semaines. La solution de lavage concentrée (R2) peut être conservée à +2- 30°C.

R7a + R7b : après reconstitution, les réactifs conservés à +2-8°C sont utilisables pendant 4 semaines.

R8 + R9 : Après reconstitution les réactifs conservés à l'obscurité sont utilisables 6 heures à température ambiante (18-30°C).

5 - *MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI*

- Eau distillée.
- Hypochlorite de sodium (eau de javel) et bicarbonate de sodium.
- Pipettes, multipipettes automatiques ou semi-automatiques, réglables ou fixes, pour mesurer et délivrer 25 µl, 50 µl, 75 µl, 80 µl et 100 µl.
- Eprouvettes graduées 25 ml; 100 ml; 1000 ml.
- Conteneur de déchets contaminés.
- Bain-marie ou incubateur de microplaques thermostaté à 37°C ± 1°C *(*)*.

- Dispositif de lavage manuel, semi-automatique ou appareil de lavage pour plaque de microtitration *(*)*.
- Appareil de lecture pour microplaques équipé de filtres 450nm et 620-700nm *(*)*.
- Papier absorbant.

(*) Nous consulter pour une information précise concernant les appareils validés par nos services techniques.

6 - ÉCHANTILLON

Prélever un échantillon de sang selon les pratiques en usage.

Les tests sont effectués sur des échantillons non dilués de sérum ou de plasma (collectés avec des anticoagulants comme l'EDTA, l'héparine, le citrate, l'ACD).

Extraire le sérum ou le plasma du caillot ou des globules rouges dès que possible pour éviter toute hémolyse. Une hémolyse très prononcée peut affecter les performances du test. Les échantillons présentant des agrégats doivent être clarifiés par centrifugation avant le test. Les particules ou agrégats de fibrine en suspension peuvent donner des résultats faussement positifs.

ne pas chauffer les échantillons.

Les échantillons seront conservés à + 2-8°C si le dépistage est effectué dans les 7 jours ou peuvent être conservés congelés à -20°C. Les plasmas devront subir une décongelation rapide par chauffage pendant quelques minutes à 40°C (pour limiter la précipitation de la fibrine).

Eviter les congélations/décongélations répétées.

Les échantillons ayant été congelés et décongelés plus de 3 fois ne doivent pas être utilisés.

Si les échantillons doivent voyager, les emballer selon la réglementation en usage pour le transport des agents étiologiques.

NE PAS UTILISER DE SÉRUMS OU PLASMAS CONTAMINÉS, HYPERLIPÉMIQUES OU HYPERHÉMOLYSES.

REMARQUE : Aucune interférence n'a été mise en évidence sur des échantillons contenant jusqu'à 90 g/l d'albumine, et 200 mg/l de bilirubine, ainsi que sur des échantillons lipémiques contenant jusqu'à 36 g/l de triglycérides et sur des échantillons hémolysés contenant jusqu'à 20 g/l d'hémoglobine.

7 - PRÉCAUTIONS

La qualité des résultats est dépendante du respect des bonnes pratiques de laboratoires suivantes :

- Le nom du test ainsi qu'un numéro d'identification spécifique du test sont mentionnés sur le cadre de chaque microplaque. Ce numéro d'identification spécifique figure également sur chaque barrette.

  Genscreen® HIV 1/2 Version 2 : Numéro spécifique d'identification = 05

  Cette identification doit être vérifiée avant chaque utilisation. Toute barrette dont le numéro de test est absent ou différent de celui correspondant au test réalisé, ne doit pas être utilisée.
- Ne pas utiliser de réactifs après la date d'expiration.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents au cours d'un même essai.

  Remarque : Il est possible d'utiliser d'autres lots de solution de lavage (R2, identifié 20X en vert sur l'étiquette), de tampon substrat (R8, identifié TMB buf. en bleu), de chromogène (R9, identifié TMB 11x . en violet) et de solution d'arrêt (R10, identifié 1N en rouge), que ceux fournis dans la trousse sous réserve d'utiliser un seul et même lot de ceux-ci au cours d'un même essai. Ces réactifs peuvent être utilisés avec d'autres produits de notre société. De plus, la solution de lavage (R2, identifié 20X en vert sur l'étiquette), peut être mélangée avec l'une des deux autres solutions de lavage inclues dans les différents kits réactifs Bio-Rad (R2, identifié 10X en bleu ou 10X en orange sur l'étiquette) correctement reconstituées, à condition qu'un seul mélange soit utilisé pour une même manipulation donnée. Contacter nos services techniques pour obtenir des informations détaillées.
- La solution de révélation (tampon substrat + chromogène) doit être colorée en rose L'apparition d'une autre coloration dans les minutes suivant la reconstitution indique que le réactif est inutilisable et doit être remplacé. Pour cette préparation, utiliser de préférence des récipients et du matériel de distribution en plastique à usage unique ou de la verrerie préalablement lavée à l'acide chlorhydrique 1N, rincée à l'eau distillée et séchée. Conserver cette solution à l'abri de la lumière.
- Avant utilisation, attendre 10 minutes pour que les réactifs s'équilibrent à la température du laboratoire.
- Reconstituer soigneusement les réactifs.
- Vérifier l'exactitude et la précision des pipettes et le bon fonctionnement des appareils utilisés.
- Ne pas modifier le mode opératoire.
- Lavage : il est indispensable de respecter scrupuleusement les procédures de lavage afin d'obtenir les performances maximales du test.

Consignes d'hygiène et de sécurité

Les contrôles positif et seuil ont été inactivés par la chaleur.

Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation du contrôle négatif, a été testé et trouvé négatif en anticorps anti-VIH1 et VIH2, en antigène HBs et en anticorps anti-VHC.
Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation du contrôle positif et du sérum seuil a été testé et trouvé négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VHC.
Du fait qu'aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'absence de virus VIH, Hépatites B ou C ou d'autres agents infectieux. Considérer ces réactifs, ainsi que les échantillons de patients, comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage.
Considérer le matériel directement en contact avec les échantillons et les réactifs, ainsi que les solutions de lavage, comme des produits contaminés.
L'autoclavage à 121°C, pendant une heure minimum, est le meilleur procédé d'inactivation des virus VIH et du virus de l'hépatite B.
NE PAS INTRODUIRE DANS L'AUTOCLAVE DE SOLUTIONS CONTENANT DE L'HYPOCHLORITE DE SODIUM.
La fiche de données de sécurité est disponible sur demande.
Le traitement des solutions et du matériel contaminés avec de l'eau de javel à la concentration finale de 5% d'hypochlorite de sodium pendant 30 minutes permet également l'inactivation des virus VIH et du virus de l'hépatite B.
Eviter tout contact du tampon substrat, du chromogène et de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses (risques de toxicité, d'irritation et de brûlures).
D'autre part, la manipulation et l'élimination des produits chimiques doivent être effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire.
Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. L'azoture de sodium peut former des azotures de plomb ou de cuivre dans les canalisations du laboratoire. Ces azotures sont explosifs. Pour éviter toute accumulation d'azotures, rincer à grande eau les canalisations si les solutions contenant de l'azoture sont éliminées par l'évier après leur inactivation.
Certains réactifs contiennent du ProClin™ 300 (0.04%, 0.1 % et/ou 0,5%)

Xi Irritant
R43 : peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau
S28-37 : Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et du savon. Porter des gants appropriés.

8 - RECONSTITUTION DES RÉACTIFS

Note : Avant utilisation, laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante (18 à 30°C).

Réactif 1 (R1) : Microplaque

Chaque support cadre contenant 12 barrettes est conditionné en sachet "ZIP". Couper le sachet à l'aide de ciseaux ou scalpel 0,5 à 1 cm au-dessus du ZIP. Ouvrir le sachet et sortir le cadre. Replacer dans le sachet les barrettes inutilisées. Refermer le sachet soigneusement et le replacer à +2-8°C.

Réactif 2 (R2) : Solution de lavage concentrée 20 fois

Diluer 20 fois la solution dans l'eau distillée. On obtient ainsi la solution de lavage prête à l'emploi. Prévoir 800 ml pour une plaque de 12 barrettes.

Réactif 3 (R3) : Sérum de contrôle négatif

Sérum humain négatif en anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2, en antigène HBs et en anticorps anti-HCV, contenant 0,1% d'azoture de sodium.

Réactif 4 (R4) : Sérum seuil

Sérum humain contenant une faible quantité d'anticorps anti-VIH négatif en antigène HBs et anticorps anti-VHC, inactivé par la chaleur, contenant 0,1% d'azoture de sodium.

Réactif 5 (R5) : Sérum de contrôle positif

Sérum humain positif en anticorps anti-VIH, négatif en antigène HBs et anticorps anti-VHC, inactivé par la chaleur, contenant 0,1% d'azoture de sodium.

Réactif 6 (R6) : Diluant pour échantillons prêt à l'emploi

Solution de sérum de veau (tampon TRIS additionné de 0,1% de chloroforme, de Proclin et d'un indicateur coloré, témoin de dépôt des échantillons).

Réactif 7a (R7a) : Conjugué lyophilisé

Antigènes VIH1 et VIH2 purifiés, marqués à la peroxydase.
Contient de la BSA et du Proclin (0,1%).
Taper doucement le flacon sur la paillasse pour détacher toute substance pouvant adhérer au bouchon de caoutchouc. Enlever le bouchon avec soin et verser le contenu d'un flacon de diluant conjugué dans le flacon de conjugué lyophilisé. Reboucher et laisser reposer pendant 10 minutes en remuant et en retournant de temps en temps pour faciliter la dissolution.

Réactif 7b (R7b) : Diluant du conjugué
Solution de lait écrémé colorée (tampon TRIS additionné de 0,1% de chloroforme et de Proclin).

Réactif 8 (R8) : Tampon substrat
Solution prête à l'emploi d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4,0 contenant 0,015% d'eau oxygénée et 4% de diméthylsulfoxyde (DMS0).

Réactif 9 (R9) : Solution de chromogène concentrée
Solution contenant du tétraméthylbenzidine (TMB). Diluer 11 fois la solution dans le tampon substrat (ex : 1 ml de réactif R9 +10 ml de réactif R8). Stabilité 6 heures.

Réactif 10 (R10)
Solution d'acide sulfurique 1N prête à l'emploi

9 - *MODE OPÉRATOIRE*

Suivre strictement le protocole proposé.
Utiliser les sérums de contrôle négatif, positif et le sérum seuil à chaque mise en oeuvre du test pour valider la qualité du test.
Appliquer les bonnes pratiques de laboratoire :

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des échantillons
2. Préparer la solution de lavage diluée,
3. Sortir le cadre support et les barrettes (R1) de l'emballage protecteur
4. Déposer directement, sans prélavage de la plaque, successivement :
   - 4.1 25 µl de diluant dans chaque cupule
   - 4.2 75 µl de sérum de contrôle négatif (R3) en A1
     75 µl de sérum de contrôle seuil (R4) en B1, C1 et D1
     75 µl de sérum de contrôle positif (R5) en E1
     75 µl du premier échantillon en F1,
     75 µl du deuxième échantillon en G1, etc..

   En fonction du système utilisé, il est possible de modifier la position ou l'ordre de distribution des contrôles.

   Homogénéiser le mélange par 3 aspirations minimum avec la pipette de 75 µl ou en agitant la microplaque après l'étape de pipetage.

   Il est également possible de déposer 100 µl d'un échantillon préalablement dilué au 3/4 (ex. 150 µl de sérum + 50 µl de diluant).

   N.B.: Il est possible de vérifier visuellement la distribution des échantillons à ce stade de la manipulation, en effet après addition des échantillons, le diluant qui est initialement violet vire au bleu .

   (cf chapitre 12 pour la vérification automatique - **VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DU CONJUGUÉ)**
5. Lorsque cela est possible, couvrir d'un film autocollant en appuyant bien sur toute la surface pour assurer l'étanchéité.
6. Incuber la microplaque au bain-marie thermostaté ou dans un incubateur sec de microplaques pendant 30 ± 5 minutes à 37°±1°C.
7. Retirer le film adhésif. Aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés (contenant de l'hypochlorite de sodium) et ajouter immédiatement dans chacune d'elles un minimum de 0,370 ml de solution de lavage. Respecter un temps de trempage (temps d'attente) minimum de 30 secondes. Aspirer de nouveau. Répéter le lavage au moins 2 fois (soit un minimum de 3 lavages au total). Le volume résiduel doit être inférieur à 10 µl (si nécessaire sécher la plaque par retournement sur une feuille de papier absorbant).
   Si l'on dispose d'un laveur automatique, respecter le même cycle opératoire (voir chapitre 10 : Remarques).
8. Distribuer rapidement 100 µl de la solution de conjugué dans toutes les cupules. Le conjugué doit être agité avant emploi.
   N.B.: La distribution du conjugué qui est coloré en vert peut être vérifiée visuellement à ce stade de la manipulation, (cf chapitre 12 pour la vérification automatique - **VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DU CONJUGUÉ)**
9. Si cela est possible, recouvrir la microplaque d'un film neuf. Incuber 30 ± 5 minutes à la température ambiante (18-30°C).
10. Retirer le film adhésif, vider toutes les cupules par aspiration et laver au moins 5 fois comme précédemment. Le volume résiduel doit être inférieur à 10 µl (si nécessaire, sécher les barrettes par retournement sur une feuille de papier absorbant).

11. Distribuer rapidement dans toutes les cupules 80 µl de la solution de révélation de l'activité enzymatique (R8 + R9) préalablement préparée. Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 ± 5 minutes à température ambiante (18 à 30°C). Lors de cette incubation, ne pas utiliser de film adhésif.
    N.B.: La distribution de la solution de révélation, qui est colorée en rose, peut être contrôlée visuellement à ce stade de manipulation : Il y a une différence de coloration significative entre une cupule vide et une cupule contenant la solution de révélation rosée. (se reporter au paragraphe 12 pour la vérification automatique VERIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DEPOT DES ECHANTILLONS ET DES REACTIFS)
12. Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation. Homogénéiser le mélange réactionnel.
    N.B.: La distribution de la solution d'arrêt, qui est incolore, peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation. La coloration du substrat, rosée (pour les échantillons négatifs) ou bleu (pour les échantillons positifs), disparaît des cupules qui deviennent incolores (pour les échantillons négatifs) ou jaunes (pour les échantillons positifs) après addition de la solution d'arrêt .
13. Essuyer soigneusement le dessous des plaques. **Au moins 4 minutes après la distribution de la solution d'arrêt** et dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction, lire la densité optique à 450/620-700 nm à l'aide d'un lecteur de plaques.
14. S'assurer avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

10 - REMARQUES

ATTENTION ÉVITER LES CONTAMINATIONS EN COURS DE MANIPULATION EN CAS DE CONTAMINATIONS (éclaboussures, etc)

- Les éclaboussures non acides doivent être nettoyées complètement avec une solution à 5 % (minimum) d'hypochlorite de sodium (eau de javel).
- Les éclaboussures acides doivent être nettoyées à sec. La zone d'éclaboussure doit ensuite être nettoyée avec une solution à 5 % (minimum) d'hypochlorite de sodium. Le matériel utilisé pour le nettoyage doit être jeté dans le conteneur de déchets contaminés puis éliminé selon les règles propres à cet effet (voir précautions § 7)
- NE JAMAIS UTILISER LE MÊME RÉCIPIENT POUR DISTRIBUER LE CONJUGUÉ ET LA SOLUTION DE RÉVÉLATION.
  CONTRÔLER LA SOLUTION DE RÉVÉLATION ENZYMATIQUE (TAMPON SUBSTRAT CHROMOGÈNE) AVANT LA DISTRIBUTION.
  Elle doit être incolore.
  L'apparition d'une coloration bleue dans les minutes suivant la reconstitution indique que le réactif est inutilisable et doit être remplacé.
  En effet, le tampon substrat, le chromogène, la solution de révélation et la solution d'arrêt peuvent être contaminés par des ions métalliques.
  Pour cette raison, veillez à utiliser de préférence des récipients et du matériel de distribution en plastique ou de la verrerie préalablement lavée à l'acide chlorhydrique 1N, soigneusement rincée à l'eau distillée et séchée.

LAVAGE : Il est indispensable de respecter scrupuleusement les procédures de lavage afin d'obtenir les performances maximales du test.

Procédures de lavage sur LP 35

Après avoir allumé le LP 35, valider l'option paramètre lavage.

Choisir un n° de test entre 1 et 20) et valider. Choisir la procédure de base 82 puis le mode plaque. Rentrer un temps de contact minimum de 04 et un temps de lavage de fond de 05. Une fois les réglages effectués, le laveur revient au mode lavage.

11 - CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La présence ou l'absence des anticorps anti VIH1 et/ou VIH2 est déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil calculée.

1) Calculer la moyenne des absorbances pour le sérum de contrôle seuil ($\overline{DOR4}$)

$$\overline{DOR4} = \frac{DO\ (B1) + DO\ (C1) + DO\ (D1)}{3}$$

2) Calcul de la valeur seuil

La valeur seuil sera déterminée par le rapport :

$$VS = \frac{\overline{DOR4}}{10}$$

3) Validation de l'essai

Le sérum de contrôle négatif doit être inférieur à 70% de la valeur seuil :

$$DOR3 < 0{,}7\ VS$$

La moyenne des sérums de contrôle seuil doit être supérieure à 0,80 :

$\overline{DOR4} > 0,8$

Facultatif : le rapport : $DOR5/\overline{DOR4}$ doit être supérieur ou égal à 1,3 (Cette norme optionnelle est applicable seulement quand la linéarité du lecteur utilisé est supérieure a 3,000).

4) Interprétation des résultats

Les échantillons dont les absorbances sont inférieures à la valeur seuil sont considérés négatifs d'après le test GENSCREEN® HIV1/2 version 2.

Toutefois, les résultats situés juste au dessous de la valeur seuil

(VS - 10% < DO<VS) doivent être interprétés avec prudence et il est conseillé de tester de nouveau les échantillons correspondants en double lorsque les systèmes utilisés et les procédures du laboratoire le permettent)

Les échantillons dont les absorbances sont égales ou supérieures à la valeur seuil sont considérés initialement positifs d'après le test GENSCREEN® HIV1/2 version 2. Ils doivent être contrôlés de nouveau en double avant l'interprétation finale.

Si après répétition de l'essai, pour un échantillon, l'absorbance des 2 doublets est inférieure à la valeur seuil, le résultat initial est non reproductible et l'échantillon est déclaré négatif selon le test GENSCREEN® HIV1/2 version 2.

L'origine des réactions non reproductibles est souvent en relation avec les causes suivantes :

- lavage insuffisant des microplaques,
- contamination des échantillons négatifs par un sérum contenant un titre élevé d'anticorps,
- contamination ponctuelle de la solution de révélation par des agents chimiques oxydants (eau de javel, ions métalliques, etc....).
- contamination ponctuelle de la solution d'arrêt.

  Si après répétition de l'essai, l'absorbance : mesurée sur l'un des deux doublets est égale ou supérieur à la valeur seuil, le résultat initial est reproductible et l'échantillon est déclaré positif selon le test GENSCREEN® HIV1/2 version 2 et traité comme indiqué dans le §13.

12 - VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE LA DISTRIBUTION DES ÉCHANTILLONS ET DU CONJUGUÉ

Vérification de la distribution des échantillons

Après la distribution successive du diluant des échantillons (R6) puis des échantillons, il est possible de vérifier la présence des échantillons à tester dans les cupules par une lecture spectrophotométrique à 620 nm: la densité optique d'une cupule contenant un échantillon devra être supérieure à 0,150 (une DO inférieure indique une mauvaise distribution de celui-ci).

Vérification de la présence de conjugué dans les cupules

Après l'étape de distribution du conjugué (R7a + R7b), il est possible de vérifier sa présence dans les cupules par une lecture spectrophotométrique à **620 nm** : la densité optique d'une cupule contenant du conjugué devra être supérieure à **0,100** (une DO inférieure indique une mauvaise distribution du conjugué dans cette cupule).

Vérification du dépôt de la solution de révélation :

Il est possible de vérifier la présence de la solution de révélation rosée par lecture automatique à **490nm** : une cupule contenant la solution de révélation doit avoir une densité optique supérieure à **0.100** (une DO plus faible indique une mauvaise distribution de la solution de révélation)

Il y a une différence de coloration significative entre une cupule vide et une cupule contenant la solution de révélation rosée.

13 - PERFORMANCES

Les études de sensibilité du test GENSCREEN® HIV1/2 version 2 ont été réalisées sur des échantillons positifs de patients atteints de SIDA ou pré-SIDA (ARC), ainsi que sur des panels de sensibilité composés d'échantillons documentés provenant de patients récemment infectés par le virus VIH:

- La sensibilité VIH1 évaluée sur 413 échantillons de patients atteints de SIDA ou pré-SIDA (ARC), positifs VIH1 groupe M et confirmés en Western-Blot ainsi que 31 échantillons VIH1 groupe O et confirmés en western-blot VIH1 a été estimée à 100%.
- La sensibilité groupe O testée également sur 4 échantillons VIH1 groupe O indéterminés en Western-Blot a été jugée satisfaisante avec 3 échantillons trouvés positifs.
- La sensibilité VIH2 évaluée sur 119 sérums dilués ou non dilués et issus de patients confirmés positifs par Western-Blot a été estimé à 100%.
- La sensibilité VIH 1 groupe M a été évaluée sur 29 panels de séroconversion commerciaux (BBI, NABI, Bioclinicals partners) ainsi que sur le panel de sensibilité de l'INTS. Les résultats sont conformes à l'état de l'art.

Sur le panel de l'INTS, les 45 échantillons de séroconversion ainsi que les 13 de per-seroconversion sont positifs.

La spécificité du test chez les donneurs de sang a été estimée à 99,98% sur 5025 échantillons testés.

3 réactions positives ont été observées lors de l'analyse de 212 patients présentant des pathologies ou des états sans relation avec le virus du SIDA (femmes enceintes, facteur rhumatoïde, Ig anti-nucléaire ou autres infections virales)

La précision du test GENSCREEN® HIV1/2 version 2 a été déterminée par l'analyse de 4 échantillons : 1 sérum négatif (éch.1), 2 sérums faiblement positifs en anticorps anti-VIH 1 (éch. 2 et 3) et 1 sérum fortement positif en anticorps anti-VIH1 (éch.4). La répétabilité (intra-essai) de la technique a été évaluée par l'analyse de ces 4 échantillons qui ont été testés 30 fois au cours de la même manipulation alors que la reproductibilité (inter-essai) a été évaluée par l'analyse de ces 4 mêmes échantillons qui ont été testés en triplet sur 5 jours différents à raison de 2 essais indépendants par jour. Les résultats sont regroupés dans les 2 tableaux suivants :

Tableau 1 : Répétabilité (intra-essai)

n = 30	éch. 1	éch. 2	éch.3	éch.4
moyenne des ratios*	0,12	3,34	9,05	19,6
déviation standard	0,04	0,45	0,30	0,73
CV (%) ratios*	31,5%	13,6%	3,3%	3,7%

*ratios = OD/C.O.

Tableau 2 : Reproductibilité (inter-essai)

n = 30	éch. 1	éch. 2	éch.3	éch.4
moyenne des ratios*	0,12	3,43	9,27	19,35
déviation standard	0,02	0,41	0,89	1,93
CV (%) ratios*	19,3%	12,1%	9,65%	10,0%

*ratios = OD/C.O.

14 - LIMITES DU TEST

De très faibles taux d'anticorps peuvent ne pas être détectés lors d'infection récente, en conséquence un résultat négatif signifie que l'échantillon contrôlé ne contient pas d'anticorps détectables par le test GENSCREEN® HIV1/2 version 2. Un tel résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection VIH1/VIH2.

La variabilité des virus VIH1 (groupe M, groupe O) et VIH2 ne permet pas d'exclure la possibilité de réactions faussement négatives. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance que le virus VIH est absent.

Toute technique ELISA hautement sensible peut produire des réactions faussement positives. Afin de vérifier la spécificité de la réaction, tout échantillon trouvé positif reproductible (selon les critères d'interprétation du test GENSCREEN® HIV1/2 version 2) doit être soumis à un test de confirmation (Western-Blot)

Le chauffage des échantillons peut affecter la qualité des résultats.

La méthode colorimétrique de vérification du dépôt des échantillons et/ou des conjugués et/ou de la solution de révélation ne permet pas de vérifier l'exactitude des volumes distribués mais seulement de montrer la présence d'échantillons et/ou des conjugués et/ou de la solution de révélation. Le taux de réponses erronées obtenues avec cette méthode est liée à la précision du système utilisé (des CV cumulés de pipetage et de lecture supérieurs à 10% peuvent dégrader significativement la qualité de cette vérification).

Dans le cas d'un lavage inefficace après l'étape d'incubation du conjugué, la vérification automatique de la distribution de la solution de révélation (par lecture à 490 nm des densités optiques des cupules) peut donner des résultats erronés avec des densités optiques supérieures à 0.100 en l'absence de solution de révélation. Cependant, ce phénomène n'a pas été observé durant les évaluations conduites sur 939 échantillons testés.

15 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARRE-SINOUSSI F., CHERMANN J.C., REY F. et al
   Isolation of a T. lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Science, 1983, 220, 868-871
2. ALIZON M., SONIGO P., BARRE-SINOUSSI F. et al.
   Molecular cloning of lymphadenopathy associated virus Nature, 1984, 312, 757-760
3. CLAVEL F., GUETARD D., BRUN-VEZINET F. et al.
   Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science. 1986, 233, 343-346
4. CLAVEL F., GUYADER M., GUETARD D. et al.
   Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. Nature, 1986, 324, 691-695
5. BRUN-VEZINET F., ROUZIOUX C., BARRE-SINOUSSI F. et al.
   Detection of IgG antibodies to lymphadenopathy associated virus (LAV) by ELISA, in patients with acquired immunodeficiency syndrome or lymphadenopathy syndrome. Lancet. 1984, June, 1253-1256

6. MATHIESEN T., CHIODI F., BROLIDEN P.A., et al.
Analysis of a subclass restricted HIV1 gp 41 epitope by omission peptides. Immunology, 1989, 67, 1-7
7. NORRBY E. , BIBERFELD G., JOHNSON PR et al.
The chemistry of site directed serology for HIV Infections. AIDS Res Human Retroviruses. 1989, 5, 487/493
8. McKEATING J.A., WILLEY R.L.
Structure and fonction of the HIV envelope. AIDS, 1989, 3, S35-S41
9. PASQUALI J.L., KIENY M.P., KOLBE H. et al.
Immunogenicity and epitope mapping of a recombinant soluble gp 160 of the human immunodeficiency virus type 1 envelop glycoprotein. AIDS Res. Human Retroviruses, 1990, 6, 1107-1113
10. NEURATH A.R., STRICK N., TAYLOR P. et al
Search for eptiope specific antibody responses to human immunodeficiency virus (HIV1) envelope glycoproteins signifying resistance to disease development. AIDS Res. Human Retroviruses, 1990, 6, 1183-1192
11. NAIR B.C., FORD G., KALYANARAMAN V.S. et al.
Enzyme immunoassay using native envelope glycoprotein (gp 160) for detection of human immunodeficiency virus type 1 antibodies. J. Clin. Microbio. 1994, 32, 1449-1456
12. ZAAIJER H.L., EXEL-OEHLERS P.V., KRAAIJEVELDT T., et al.
Early detection of antibodies to HIV1 by third generation assays. The Lancet, 1992, 340, 770-772
13. CONSTANTINE N.T., VAN DER GROEN G., BELSEY E.M. et al
Sensitivity of HIV antibody assays determined by seroconversion panels AIDS, 1994, 8, 1715-1720
14. ENGELBRECHT S., DE JAGER G.J., VAN RENSBURG E.J.
Evaluation of commercially available assays for antibodies to HIV1 in serum obtained from south african patients infected with HIV1 subtypes B, C, and D. J. Med. Viroloogy 1994, 44, 223-228
15. COUROUCE A.M. et al.
Trousses de dépistage des anticorps anti VIH1 et VIH2. Spectra Biologie, 1994, 6, 43-51
16. DONDERO T.J., HU D.J., GEORGE J.R.
HIV1 variants : yet another challenge to public health. The Lancet 1994, 343, 1376
17. SIMON F., LY T.D., BAILLOU-BEAUFILS A., et al
Sensitivity of screening kits for anti HIV1 subtypes O antibodies. AIDS, 1994, 8, 1628-1629
18. JANSSENS W., HEYNDRICKX L. FRANSEN et al.
Genetic and phylogenetic analysis of ENV subtypes G and H in Central Africa
AIDS Res. Hum. Retrovirus 1994, 10, 877-879
19. GAOF., YUE L. ROBERTSON D.L. et al.
Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2 :
evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. J. Virol. 1994, 68, 7433-7447

- CE marking (European directive 98/79/CE on *in vitro* diagnostic medical devices)
- Marquage CE (Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*)
- Marcodo CE (Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*)
- EG Markierung (Europäische Richtlinie 98/79/EG über *In vitro*-Diagnostika)
- Marchiatura CE (Direttiva europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro)
- Marcação CE (Directiva europeia 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*)
- CE-märkning (Europa direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter lör *in vitro*-diagnostik)
- CE-mærkningen (Europa direktiv 98/79/EF om medicinsk udstyr til *in vitro*-diagnostik)

IVD

- For *in vitro* diagnostic use
- Pour diagnostic *in vitro*
- Para diagnóstico *in vitro*
- *In vitro*-Diagnostikum
- Per uso diagnostico *in vitro*
- Para uso em diagnóstico *in vitro*
- *In vitro* diagnostik
- *In vitro* diagnose

- Manufacturer
- Fabricant
- Fabricante
- Hersteller
- Produttore
- Fabricante
- Tillverkad av
- Fremstillet af

LOT

- Batch code
- Code du lot
- Código de lote
- Chargen-Bezeichnung
- Codice del lotto
- Código do lote
- Batch nr.
- Batchkoden

- Storage temperature limitation
- Limites de températures de stockage
- Temperatura limite
- Lagerungstemperatur
- Limiti di temperatura di conservazione
- Limites de temperatura de armazenamento
- Temperaturbegränsning
- Temperaturbegrænsning

REF

- Catalogue number
- Référence catalogue
- Número de catálogo
- Bestellnummer
- Numero di catalogo
- Número de catálogo
- Katalognummer
- Katalognummer

EC REP

- Authorised Representative
- Représentant agréé
- Representante autorizado
- Bevollmächtigter
- Distributore autorizzato
- Representante Autorizado
- Auktoriserad representant
- Autoriseret repræsentant

- Expiry date YYYY/MM/DD
- Date de péremption AAAA/MM/JJ
- Estable hasta AAAA/MM/DD
- Vervvendbar bis JJJJ/MM/TT
- Da utilizzare prima del AAAA/MM/GG
- Data de expiração AAAA/MM/DD
- Utgångsdatum År/Månad/Dag
- Anvendes før ÅÅÅÅ/MM/DD

- Consult Instruction for use
- Consulter le mode d'emploi
- Consulte la instrucción para el uso
- Siehe Gebruchsanweisung
- Consultare le istruzioni per uso
- Consulte o folheto Informativo
- Se instruktionsanvisning vid användning
- Se instruktion før brug

CE 0459

BIO-RAD
3, Bd Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE
Tél. : 33 (0) 1 47 95 60 00
Fax.: 33 (0) 1 47 41 91 33

09/2006
code : 883513